

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07H 17/07

A61K 31/7048 A61P 9/10

A61P 3/06

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02112205.9

[43] 公开日 2002 年 12 月 25 日

[11] 公开号 CN 1386742A

[22] 申请日 2002.6.24 [21] 申请号 02112205.9

[71] 申请人 上海凯曼生物科技有限公司

地址 200233 上海市田林路 219 号

[72] 发明人 龚邦强 韩兴春 高东雁

[74] 专利代理机构 上海开祺专利代理有限公司

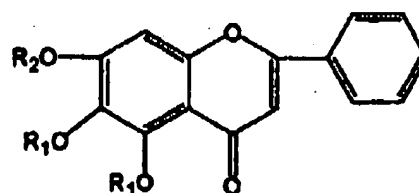
代理人 费开建

权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 16 页

[54] 发明名称 一类黄酮衍生物及其制备方法和用途

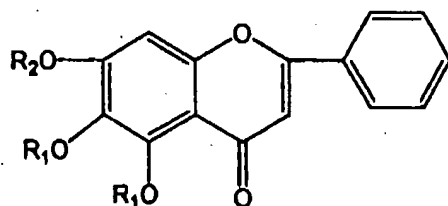
[57] 摘要

本发明提供一类具有右式结构的黄酮衍生物, 经生物学试验, 证实该类化合物可用于降低血清甘油三脂, 降低 LDL 胆固醇水平以及升高 HDL 胆固醇水平, 可在治疗和预防诸如外周血管疾病、冠心病、中风疾病、血管再狭窄等血管疾病的药物中应用。



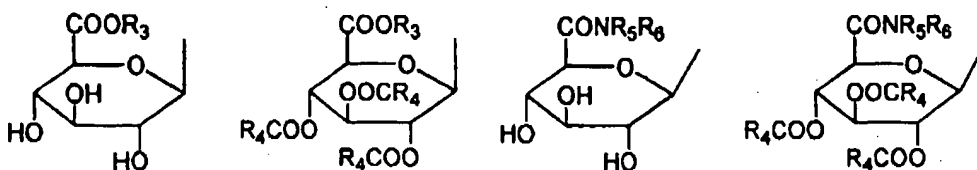
ISSN 1008-4274

1、一类结构如下的黄酮衍生物:



其中  $R_1$  为 H、 $-\text{COR}_4$

$R_2$  为



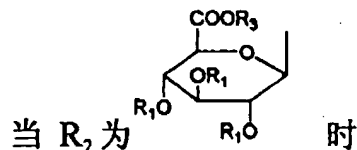
$R_3$  为  $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$  的直链或支链烷烃,

$R_4$  为  $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$  的直链或支链烷烃、苯基或取代苯基

$R_5$ 、 $R_6$  为 H、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$  直链或支链烷烃,

及其它们的生理可接受的盐。

2、根据权利要求 1 所述的黄酮衍生物其特征在于

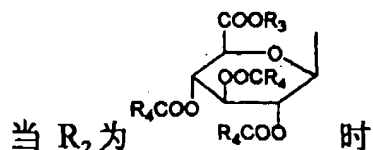


$R_1$  为 H

$R_3$  为 H、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$  直链或支链烷烃

及其它们的生理可接受的盐。

3、根据权利要求 1 所述的黄酮衍生物其特征在于



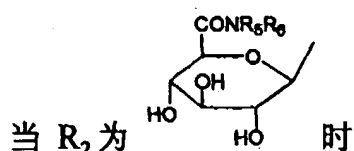
$R_1$  为  $COR_4$

$R_3$  为 H、 $C_1-C_3$  直链或支链烷烃

$R_4$  为  $C_1-C_3$  直链或支链烷烃、苯基或取代苯基

以及它们生理可接受的盐。

4、根据权利要求 1 所述的黄酮衍生物其特征在于



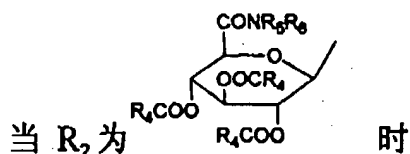
$R_1$  为 H

$R_5$  为 H、 $C_1-C_3$  直链或支链烷烃

$R_6$  为 H、 $C_1-C_3$  直链或支链烷烃

以及它们生理可接受的盐。

5、根据权利要求 1 所述的黄酮衍生物其特征在于



$R_1$  为  $COR_4$

$R_4$  为  $C_1-C_3$  直链或支链烷烃、苯基或取代苯基

$R_5$  为 H 或  $C_1-C_3$  直链或支链烷烃

$R_6$  为 H 或  $C_1-C_3$  直链或支链烷烃

以及它们生理可接受的盐；

6、如权利要求 1 所述的黄酮衍生物的制备方法其特征在于

a、由起始原料 I 在酸性条件下与醇反应得化合物 II，

b、化合物 II 与酸酐或酰氯反应得化合物 III，

c、化合物 II 与取代胺（氨）反应得化合物 IV

d、化合物 IV 与酸酐或酰氯反应得化合物 V;

- 7、如权利要求 1 所述黄酮衍生物在升高高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C), 降低低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和甘油三脂 (TG) 的调节血脂变化的药物中应用;
- 8、根据权利要求 1 所述黄酮衍生物在预防治疗外周血管疾病、血管再狭窄疾病的药品中应用;
- 9、根据权利要求 1 所述黄酮衍生物在预防和治疗冠心病和中风疾病的药物中就用。

## 一类黄酮衍生物及其制备方法和用途

### 背景技术

本发明涉及天然产物的合成和化合物用途,更具体说是黄酮衍生物及其制备方法和在治疗和预防外周血管疾病、冠心病、血管再狭窄等疾病的药物中应用。

### 发明背景

由血脂异常,如高低密度脂蛋白胆固醇血症、高甘油三脂血症、尤其低高密度脂蛋白胆固醇血症引起的血管疾病,如外周血管疾病、冠心病、中风疾病、血管再狭窄等血管疾病是中国和西方国家致死疾病中的头号杀手。在中国冠心病、中风疾病、血管再狭窄等血管疾病发病率占总人口的4%以上。在美国为43%。该病最早的病因学原理起源于50、60年代。认为是体内过量的甘油三酯所致。所以第一代抗该类疾病药的主要机理是降血浆甘油三脂,其代表是Fibrate类药。进入70年代,科学家发现,高血浆甘油三脂只是此类疾病形成的一个重要原因,并非主要病因。该病主要病因是高血清总胆固醇或高低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)(Gordon et al.1981;Stamler et al.1986; Pooling Project Research Group 1978; Anderson et al. 1987)。流行病学调查揭示,血清总胆固醇每增加1%,冠心病危险因素增加2%(NCEPR 1991)。临床研究发现,降低血清胆固醇水平可以减少冠心病的发病率,阻滞此类疾病的发展(LPCP 1984; Frick 1987)。胆固醇不溶于水,不能在血液里转运。它们必需与脂蛋白结合才能在血液里转运,人血液里有四种脂蛋白负责胆固醇的运载。它们是低密度脂蛋白(LDL),高密度脂蛋白(HDL),极低密度脂蛋白质(VLDL)和中间密度脂蛋白(IDL)。在正常人中,三分之二的总胆固醇由LDL运载。LDL携带内源或外源胆固醇,穿过血管壁,进入内皮下(subendothelium)。在内皮下,LDL胆固醇被氧化成氧化型LDL胆固醇(oxLDL),并通过清道夫受体被巨噬细胞以胆固醇酯的形式在细胞内积聚。

大量胆固醇酯积聚在巨噬细胞内形成了泡沫细胞。积聚了大量胆固醇酯的泡沫细胞沉积在血管内皮下，形成了血管壁硬化斑块核心。资料表明，由 LDL 运载的胆固醇是导致冠心病、中风疾病、血管再狭窄等血管病的主要根源 (Goldstein 1989; Vega 1986; Innerarity 1990; Rauth 1992)。所以 LDL 胆固醇被称为坏胆固醇。由高血清胆固醇引起的血管壁硬化斑块不但是冠心病的主要根源，同时也是脑血管疾病，如脑血栓形成，中风的重要病因。此外人脑细胞内积聚的高胆固醇酯还可能和老年性痴呆症的形成有关。体内胆固醇来源有内源和外源。外源胆固醇来自于饮食，内源胆固醇是自体合成的结果。内源胆固醇合成亢进和家族性高胆固醇血症在西方国家较为普遍。这种疾病必须通过药物控制。在美国，40%以上的成年人的 LDL 胆固醇（坏胆固醇）含量超过正常水平。由于胆固醇在形成心脑血管疾病中的重要作用，近十多年来，美国及欧洲制药公司都把其抗冠心病、中风疾病、血管再狭窄等血管病药的研究和开发放到降低血清总胆固醇及 LDL 胆固醇上。这就形成了第二代抗心脑血管病治疗药。这些药中疗效最显著的有 Merck 药厂的 Zocor 和 Warner-Lambert / Parke-Davis 1997 年上市的 Lipitor。这些药的作用机理都是抑制人体胆固醇合成的关键酶 HMG-辅酶 A 还原酶。虽然 HMG-辅酶 A 还原酶抑制剂能显著的降低血清总胆固醇，防止血管壁硬化形成、阻止其发展，从而降低心脑血管病发病和死亡。但它只能减少内源性胆固醇合成及降低家族性高胆固醇血症引起的冠心病的发展或恶化。对于治疗外源性胆固醇增多引起的心脑血管疾病，对于治疗低高密度脂蛋白引起的心脑血管疾病，对于消除已进入巨噬细胞内的内源和外源胆固醇和抑制由此导致的血管壁硬化斑块形成，对于去除血管壁硬化斑块中积聚的胆固醇，使硬化血管回复正常，则作用不大。

医学研究证明，巨噬细胞吞噬和积聚胆固醇，转换成泡沫细胞，沉积在血管壁内皮下是血管壁硬化斑块形成的基础。清除积聚在血管壁巨噬细胞/泡沫细胞内的胆固醇，将其转运到肝脏分解，是治疗单纯降血清胆固醇所不能达到的，是根治冠心病、中风疾病、血管再狭窄等血管病的最新的有

效手段 (Francis and Perry 1999; Duriez and Fruchart 1999; Dansky et al. 1999)。清除巨噬细胞/泡沫细胞及血管壁硬化斑块内胆固醇的唯一的有效武器是 HDL。近年来, 西方心血管疾病研究人员及制药公司开始把研究方向放到另一类抗血管壁硬化斑块形成药, 即升高密度脂蛋白 (HDL) 药上来。高密度脂蛋白 (KDL) 是另一重要的胆固醇载体, 它在运载胆固醇方面的功能与 LDL 截然相反。HDL 可以刺激血管内皮下巨噬细胞内胆固醇酯水解, 并将水解的非酯化胆固醇从巨噬细胞内转运至肝脏分解。更为重要的是, HDL 能刺激沉积于血管壁和血管壁硬化斑块中巨噬细胞/泡沫细胞和平滑肌细胞内胆固醇酯水解。非酯化胆固醇被 HDL 从泡沫细胞转运至肝脏分解 (Alan et al. 1996), 从而去除了血管壁硬化斑块赖以形成的基础。所以 HDL 的重要功能被称为胆固醇逆相转运 (Reverse Cholesterol Transportation)。胆固醇逆相转运的结果是①抑制胆固醇酯在巨噬细胞内累积, 阻止其转化为泡沫细胞, 从而防止了血管壁硬化斑块的形成; ②因为 HDL 具有独特的转运了血管壁硬化斑块内巨噬细胞/泡沫细胞和平滑肌细胞里胆固醇至肝脏分解的作用, 从而使硬化血管壁逐步回复正常。HDL 的此二项功能一直是西方医学界在治疗冠心病、中风疾病、血管再狭窄等血管病中梦寐以求的效果。此外, HDL 含有 paraoxonase (PON), PON 可以抑制 LDL 氧化, 防止 LDL 被巨噬细胞吞噬, 产生泡沫细胞。HDL 还可以刺激内皮细胞释放前列环素 (PI), 增加胆固醇酯水解和胆固醇转运出细胞。HDL 的作用对象不分内源或外源胆固醇。基础及临床研究证实, 每增加 1mg/dl HDL 胆固醇, 冠心病死亡危险即下降 2.5% (Alan et al. 1996)。因此低血浆 HDL 是比高血浆胆固醇更重要的致冠心病的危险因子 (Alan et al. 1996)。升高血浆 HDL 就成为消除血管壁硬化斑块, 治疗冠心病、中风疾病、血管再狭窄等血管病的重要手段。

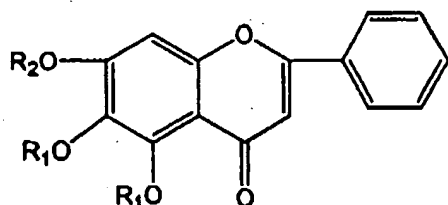
### 发明内容

本发明目的是寻找一类能提高高密度脂蛋白胆固醇, 降低低密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯的黄酮衍生物。

本发明的另一目的是提供一种制备黄酮衍生物的方法。

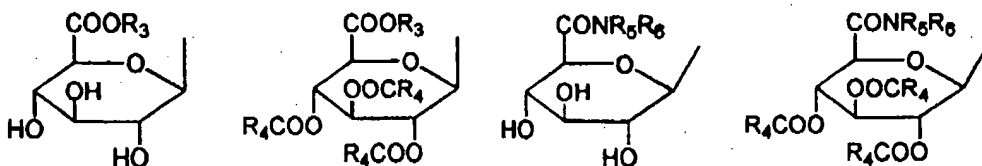
本发明的再一个目的是提供黄酮衍生物在医药或治疗上的用途。

一类结构式如下的黄酮衍生物



其中  $R_1$  为 H、 $C_1$ - $C_3$  的直链、支链烷烃、苯基、取代苯基；

$R_2$  为



$R_3$  为 H、 $C_1$ - $C_3$  的直链或支链烷烃；

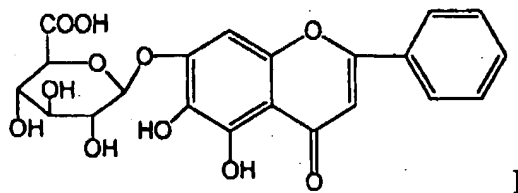
$R_4$  为 H、 $C_1$ - $C_3$  的直链或支链烷烃；

$R_5$ 、 $R_6$  各自为 H、 $C_1$ - $C_3$  的直链或支链烷烃；

以及它们生理可接受的盐。

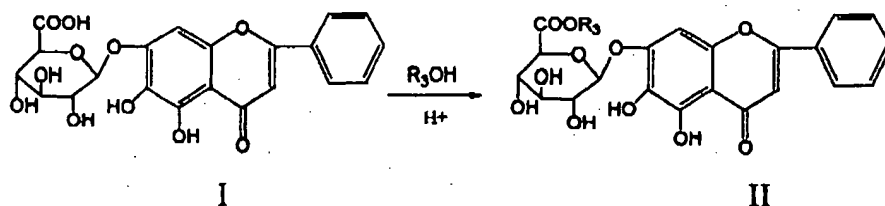
本发明可通过下列步骤实施：

化合物 I 为起始原料，它可从植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis georgi*) 中提取分离获得，



I

化合物 I 在酸性条件下与  $C_1$ - $C_3$  的低级醇进行酯化反应得化合物 II

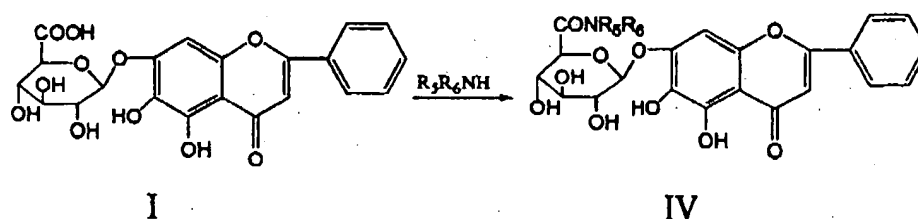
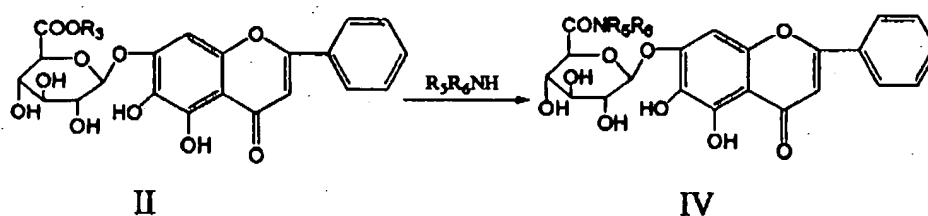
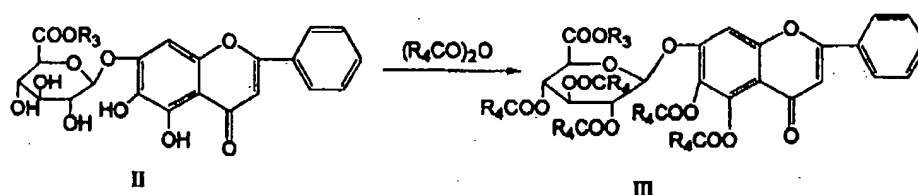


I

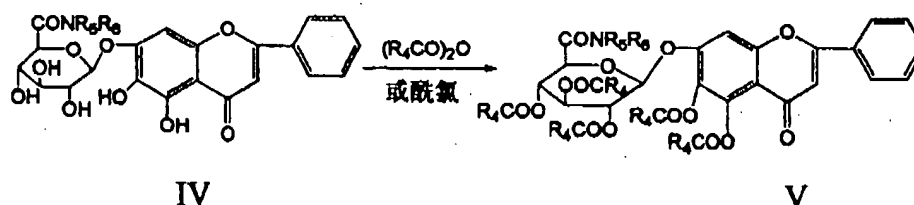
II



化合物 II 与酸酐或酰氯反应得化合物 III，酰氯慢慢加入反应物中。



化合物 II 在 DMF 溶剂中搅拌加热 50°-100°C 慢慢滴加正丁胺反应，反应结束倒入水中，用酸调节 PH 至酸性，析出固体，得化合物 IV。



化合物 IV 在与酸酐或酰氯进行酰化反应，将羟基全部酰化得化合物 V。

采用激发人源 PPAR $\alpha$  的方法，通过 PPAR $\alpha$  调控激发人载脂蛋白 AI (ApoAI) promotor 来提高人肝细胞 ApoAI 生产，激发人肝细胞 ABC1 基因表达，升高人肝细胞 ApoAII 生产，抑制人肝细胞 ApoCIII 生产，增加人肝脏细胞清道夫受体 BI (SRBI) 表达。化合物 I 并能激发人肝细胞肝 X 受体 $\alpha$  (LXR $\alpha$ )，由此来达到调节血脂变化，治疗诸如外周血管疾病、冠心病、中风疾病和血管再狭窄等血管疾病。

本发明应用上述提及的黄酮衍生物对以上所述的作用机理进行基因、酶、受体研究如下：用 I、II、III、IV、V 类化合物首先激发人源 PPAR $\alpha$ ，通过激发的 PPAR $\alpha$ 调控激发人载脂蛋白 AI (ApoAI) promotor，调控提高人肝细胞 ApoAI 生产，激发人肝细胞 ABC1 基因，升高人肝细胞 ApoAII 生产，抑制人肝细胞 ApoCIII 生产，增加人肝脏细胞清道夫受体 BI (SRBI) 表达，式 I 化合物并能激发人肝细胞肝 X 受体 $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) 的方法来达到调节血脂变化治疗诸如外周血管疾病、冠心病、中风疾病和血管再狭窄等血管疾病。

本发明采用化合物 I 为代表对以上所述的作用机理进行基因、酶、受体研究作详细描述如下：

#### 1、化合物 I 激发人 ABC1 基因测定：

HDL 是转运血管壁巨噬细胞/泡沫细胞内胆固醇到肝脏代谢出体外的关键物质，但 HDL 转运作用需一种称之为胆固醇外流调节蛋白 (CETP) 的协调。CETP 在细胞内协调将胆固醇运到内膜上，胆固醇再通过膜通道转运到细胞表面。HDL 将运到细胞表面的胆固醇载运到肝脏分解。控制 CETP 的基因称为 ABC1 基因。

以下方法被用来测定 HepG<sub>2</sub> 细胞内 ABC1 Promoter 激发（详细方法见龚邦强等的中国专利，申请号：01105303.8）

- 1) 用稳定转染了 ABC1 基因的 HepG<sub>2</sub> 细胞株取 0.5ml (浓度为  $2 \times 10^4$ /ml) 细胞悬液接种于 48 孔板中同瞬转染细胞培养条件培养 24 小时。
- 2) 加 ABC1 激发剂于细胞培养液内和细胞培养 24 小时。
- 3) 倾去培养液，以 PBS 缓冲液洗涤细胞二次，待测定。测定方法见下：

##### A 配制 Luciferase 测定试剂

将 Luciferase Assay Substrate 冻干粉全部溶于 10ml Luciferase Assay Buffer II，混匀，即可。每次反应需 100  $\mu$ l。使用前必须置室温平衡。

##### B 配制 PBS 缓冲液

##### C 配制 $1 \times$ CCLR (Cell Culture Lysis Reagent)

以4倍体积之双蒸水稀释5×CCLR即得1×CCLR。使用前必须置室温平衡。

操作步骤:

- 1) 吸去细胞培养液, 用PBS Buffer(1ml)洗2遍, 注意不要移动细胞。
- 2) 每一48孔板孔中加65μl 1×CCLR, 覆盖细胞。
- 3) 充分吹打细胞, 将细胞碎片和液体转入离心管, 12,000×g离心5秒, 将上清转入新管中。如时间来不及, 需将之保存于-70℃。
- 4) 将20 μl 细胞抽提液与100 μl 的 Luciferase Assay Reagent (室温平衡) 用枪头混匀。
- 5) 设置 Luminometer (型号: Turner Designs-2010, Turner Designs Instrument 公司, Sunnyvale, CA): STD 模式, 2秒 delay, 10秒检测。
- 6) 将管子放入 Luminometer 中, 按 Go 开始检测 (检测需在10秒内进行, 时间过长, 光密度会衰变)。

2、化合物I激发HepG2细胞内ApoAI Promoter的测定 (详细方法见龚邦强等的中国专利, 申请号: 00125733.1)

- 1) 用稳定转染细胞株: 取 $1 \times 10^4$ 细胞接种于48孔培养板中, 每孔含0.5ml 成分同于瞬转染细胞培养条件培养24小时。
- 2) 加ApoAI激发剂于细胞培养液内和细胞培养24小时。
- 3) 倾去培养液, 以PBS缓冲液洗涤细胞二次, 待测定。测定方法如下:

A 配制 Luciferase 测定试剂

将 Luciferase Assay Substrate 冻干粉全部溶于10ml Luciferase Assay Buffer II, 混匀, 即可。每次反应需100 μl。使用前必须置室温平衡。

B 配制 PBS 缓冲液

C 配制 1×CCLR(Cell Culture Lysis Reagent)

以4倍体积之双蒸水稀释5×CCLR即得1×CCLR。使用前必须置室温平

衡。

测定步骤:

- 1) 吸去细胞培养液, 用 PBS Buffer(1ml)洗 2 遍, 注意不要移动细胞。
  - 2) 48 孔板每一孔中加 65 $\mu$ l 1 $\times$ CCLR, 覆盖细胞。
  - 3) 充分吹打细胞, 将细胞碎片和液体转入离心管, 12, 000 $\times$ g 离心 5 秒, 将上清转入新管中。如时间来不及, 需将之保存于-70 $^{\circ}$ C。
  - 4) 将 20  $\mu$ l 细胞抽提液与 100  $\mu$ l 的 Luciferase Assay Reagent (室温平衡) 用枪头混匀。
  - 5) 设置 Luminometer (型号: Turner Designs- 2010, Turner Designs Instrument 公司, Sunnyvale,CA): STD 模式, 2 秒 delay, 10 秒检测。
  - 6) 将管子放入 Luminometer 中, 按 Go 开始检测 (检测需在 10 秒内进行, 时间过长, 光密度会衰变)。
- 3、化合物 I 激发 HepG2 细胞生产 ApoAI 蛋白的测定 (详细方法见龚邦强等的中国专利, 申请号:01105236.8)

测定步骤

1) 抗原包板

Ultra Pure Human Apolipoprotein AI 蛋白, (Academy Bio-Medical Company, Inc.)稀释至 200ng/ml, 加入 Nunc 酶标板中, 每孔 50 $\mu$ l, 置湿盒中, 包板条件为 37 $^{\circ}$ C 2 小时或 4 $^{\circ}$ C 16 小时, 蒸馏水洗板 3 次, 每孔加入封闭液 100 $\mu$ l, 室温放置 1 小时以上, 用前再洗板 3 次。

2) 孵育

在普通 96 孔板中, 混合一抗 Goat anti-human ApoAI(Academy Bio-Medical Company, Inc.)、二抗 Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)(Jackson ImmunoResearch)和待测培液或标准:

标准浓度配制: ApoAI 等比梯度稀释, 最终浓度为 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 ng/ml;

抗体稀释: 一抗 1:50000, 二抗 1:20000;

空白孔: 100 $\mu$ l 缓冲液;

最大结合孔: 50 $\mu$ l 抗体混合液, 50 $\mu$ l 缓冲液;

标准/样品孔: 每孔加入抗体混合液 50 $\mu$ l, ApoAI 标准或待测培养液 50 $\mu$ l;

振荡混匀, 37°C 2 小时或 4°C 16 小时孵育以上。

### 3) 抗体捕获

将 96 孔板中的孵育液转移至包被好的 Nunc 酶标板中, 室温反应 30 分钟, 其间缓缓摇动。

### 4) 检测

以蒸馏水洗板 3 次, 每孔加入 100 $\mu$ l 新配制的含邻苯二胺 (O-Phenylenedimine, OPD) 的缓冲底物显色液, 避光反应 30 分钟, 加入 25 $\mu$ l 终止液终止反应, 与酶标仪波长 492nm 处测定吸光值。

### 4、化合物 I 调节大鼠血脂的研究按下面的实验方案实施。

从西普尔-必凯实验动物有限公司(SIPPR/BK Ltd)获得雄性清洁级 Sprague-Dawley 大鼠。体重在 180-200g 之间 (动物合格证号: 沪动合证字 152 号)。饲养于室温 22-24°C, 湿度 50-70%, 常压环境, 自然昼夜。每笼 3-4 只大鼠, 给予西普尔-必凯公司的基础大鼠饲料, 自由进水 (除菌纯净水)。预养一周后, 下午 (5: 00-7: 00) 大鼠眼眶后采血, 血样 4°C 放置 30 分钟后, 在 4°C 环境中, 5000 转/分钟离心 15 分钟, 取血清, 4°C 冰箱保存, 次日送上海市临床检验中心测定血脂。根据血脂水平, 随机分组, 15 只/组, 使每组动物达到均衡随机。每天上午 6: 00 至 8: 00 和下午 4: 00 至 6: 00 分别腹腔注射 I (I 溶于 0.1N NaOH, 用 0.1N HCL 调至 PH=7.4 (室温配制)), 阴性对照组仅腹腔注射等容量的生理盐水 (相当于体重 0.5%), 同时设立 gemfibrozil (100mg/kg/day) 作为阳性对照组, gemfibrozil 是国际医学界公认的有效调节血脂药, 其主要作用在于降低血清甘油三脂。给药 14 天后, 禁食 12 小时以上, 于下午 (5: 00-7: 00) 眼眶后采血, 按以上方法得血清, 4°C 冰箱保存, 次日送上海市临床检验中心测定血脂。动物无痛苦 (乙醚吸

入法)处死后立即取肝,除去残血,称肝重和体重,计算肝重/体重比率。

血样分析血清总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、丙氨酸转移酶、门冬氨酸转移酶。给药前后各测定血样一次。由上海市临床检验中心用DAKE-RXL全自动生化分析仪测定血样品。使用试剂为原装定标液、质控、测试试剂盒(酶学法)。

化合物I给动物剂量为20, 80, 240mg/公斤体重/天,分两次给药,上下午各一次。结果显示化合物I能显著降低血清甘油三脂,降低程度随剂量升高而有下降,三个剂量的降低百分率分别为56%, 49%, 46%,远远高于阳性对照组gemfibrozil,阳性对照组gemfibrozil仅降低36%;化合物I能显著降低LDL-C,降低程度呈剂量依赖型,三个剂量的降低百分率分别为14%, 14%, 22%,阳性对照组gemfibrozil仅降低15%;I化合物能显著升高HDL-C,升高程度呈剂量依赖型,升高百分率分别为23%, 30%, 47%,而阳性对照组gemfibrozil则基本无升高HDL作用。式I化合物能显著升高HDL-C/TC比值。I化合物80mg/公斤体重/天剂量升高LCAT活性,升高百分率达36.7%。化合物I在显著调节血脂含量的同时,与阳性对照药gemfibrozil相比,它不增大肝脏/体重比系数,而gemfibrozil显著升高肝脏/体重比系数,即对肝脏无损伤功能。

以上这些血样分析数据具有重要的预防和治疗外周血管疾病、冠心病、中风疾病和血管再狭窄等血管疾病的作用。本发明的另一实施方案为治疗和预防外周血管疾病、冠心病、中风疾病和血管再狭窄等血管疾病。它包括对需要治疗的哺乳动物给予式I化合物的有效剂量。有效剂量是指治疗或预防哺乳动物血管病所需要的剂量。该化合物通常以约50mg至2000mg/天给药,每天一至四次给药。这些相同的剂量水平可用于血管疾病的治疗和预防,用于升HDL-C、降LDL-C和TG。

#### 附图说明

图1为化合物I不同浓度激发ABC1 Promoter的比例。

图2为化合物I不同浓度增加HepG-2细胞生产ApoA-I蛋白。

图3为化合物I不同浓度增加HepG-2细胞生产APOA-II蛋白。

图4为化合物I不同浓度对THP-1细胞表达SR-BI水平的影响。

图5为化合物I抑制HepG-2细胞生产APOA-III蛋白。

图6为化合物I不同浓度增加LXR $\alpha$ 的配体结合区活性比率。

图7为化合物I升高SD大鼠血清高密度脂蛋白胆固醇水平。

图8为化合物I升高SD大鼠血清高密度脂蛋白胆固醇百分比例。

图9为化合物I比高SD大鼠血清HDL-C/TC的比值。

图10为化合物I降低SD大鼠血清甘油三脂(TG)水平。

图11为化合物I降低SD大鼠血清甘油三脂(TG)百分率。

图12为化合物I降低SD大鼠血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平。

图13为化合物I降低SD大鼠LDL-C百分率。

图14为化合物I降低大鼠的血清非高密度脂蛋白胆固醇水平。

图15为化合物I对SD大鼠血清总胆固醇(TC)水平影响。

图16为化合物I和Gemfibrozil对SD大鼠肝重/体重比值的影响。

本发明的有益效果:

1、本发明采用从植物黄芩中提取分离获得的化合物I为起始原料,来源比较广,制备黄酮衍生物化学合成比较简便,且产率比较高。相对成本低,适合工业生产。

2、本发明提供的化合物从疾病的发病机理来设计,并用实验证实采用调节人血脂变化来治疗外周血管疾病、冠心病和血管狭窄等疾病效果明显,证实该类化合物能在上述疾病的治疗药物中应用。

### 具体实施方式

本发明化合物制备有关核磁共振测定由中科院上海有机化学研究所分析室完成,柱层析硅胶为300-400目,由青岛海洋化工厂生产。

#### 实施例1

7-O-( $\beta$ -D-葡萄糖醛酸乙酯基)-5,6-二羟基-2-苯基-4H-1-苯并吡喃-4-酮

## 合成

将化合物 I 20.0g (44.8mmol), 对甲基苯磺酸 2g 加入到 1500ml 无水乙醇中, 在油浴中加热回流至澄清后, 再回流 2 小时。然后将回流装置改成蒸馏装置, 常压下将反应液浓缩至约 500ml, 冷却, 抽滤, 滤饼用去离子水洗至中性, 烘干得实验产物 18.5g, 收率 87%。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO)  $\delta$  ppm 1.20(3H, m), 4.09-4.20(3H, m), 5.27-5.53(4H, m), 7.00(1H, s), 7.06(1H, s), 7.56-7.63(3H, m), 8.06-8.09(2H, m), 8.67(1H, s), 12.58(1H, s)。

同法可制备 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 直链或支链烷烃获得的酯。

## 实施例 2

7-O-( $\beta$ -D-2, 3, 4-三乙酰氧基葡萄糖醛酸乙酯基)-5, 6-二乙酰氧基-2-苯基-4H-1-苯并吡喃-4-酮

实施例 1 反应产物 30.0g (63.0mmol)、乙酸酐 600ml、无水乙酸钠 100g 加入到 1000ml 圆底烧瓶中, 搅拌下, 加热回流 3 小时。减压下蒸干反应液, 得到淡黄色固体。上述固体冷却后, 向其中加入 100ml 甲醇, 浸泡过夜, 抽滤, 得到的白色固体用乙酸乙酯重结晶, 得白色晶体 27.5g, 收率 64%。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 1.27(3H, m), 2.06(9H, s), 2.30(3H, s), 2.43(3H, s), 4.20-4.34(3H, m), 5.26-5.39(4H, m), 6.62(1H, s), 7.08(1H, s), 7.50-7.54(3H, m), 7.85-7.88(2H, m)。

同法可制备 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 低级酸酐所得的酰化。

## 实施例 3

7-O-( $\beta$ -D-葡萄糖醛酸丁酰胺基)-5, 6-二羟基-2-苯基-4H-1-苯并吡喃-4-酮  
实验 1 反应产物 1.29g (2.7mmol) 溶解在 15mlDMF 中, 并置于 90℃ 的油浴中搅拌, 向其中缓慢加入正丁胺 1g (13.5mmol), 保持加热搅拌过夜。反应液倒入 200ml 水中, 用冰乙酸调节 PH 至 2, 抽滤析出的固体, 烘干, 得产物 1.1g, 收率 81%。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO)  $\delta$  ppm 0.69(3H, m), 1.19-1.37(4H, m), 3.12(2H, m), 3.88(1H, d), 5.02-5.55(4H, m), 6.69(1H, s), 7.00(1H, s), 7.55-8.11(5H, m), 8.74(1H, s), 12.54(1H, s)。



同法可制备 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 的酰胺。

#### 实施例 4

7-O-( $\beta$ -D-2, 3, 4-三乙酰氧基葡萄糖醛酸丁酰胺基)-5, 6-二乙酰氧基-2-苯基-4H-1-苯并吡喃-4-酮

将实验 3 的反应产物 0.25g 溶解于 10ml 乙酸酐中, 再加入 2g 乙酸钠后, 置于约 100℃ 的油浴上加热搅拌, TLC 跟踪反应至结束后, 抽滤, 滤液减压浓缩, 残余固体用硅胶柱层析后, 得白色固体产物 0.18g, 收率 50%。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 0.86(3H, m), 1.24-1.55(4H, m), 2.04-2.11(9H, m), 2.33(3H, s), 2.45(3H, s), 3.10-3.38(2H, m), 4.22(1H, d), 5.20-5.48(4H, m), 6.64(1H, s), 6.97(1H, s), 7.53-7.56(3H, m), 7.87-7.89(2H, m)。

同法可制备 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 的酸酐所得的酰化物。

#### 实施例 5

7-O-( $\beta$ -D-2, 3, 4-三苯甲酰氧基葡萄糖醛酸乙酯基)-5, 6-二苯甲酰氧基-2-苯基-4H-1-苯并吡喃-4-酮

将实验一的产物 1.0g(2.1mmol)溶解于由 15ml 吡啶和 5ml 氯仿组成的混和溶剂中。再向其中缓慢滴入 2.3ml(20mmol)苯甲酰氯。半小时后, 将反应液置于 70℃ 的油浴上, 继续反应 3 小时, TLC 显示反应结束。反应液减压浓缩, 残余固体用硅胶柱层析后, 得白色固体产物 1.2g, 收率 57.5%。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 1.14(3H, m), 4.16-4.23(2H, m), 4.68(1H, d), 5.69-6.01(4H, m), 6.62(1H, s), 7.25-8.12(31H, m)。

#### 实施例 6

化合物 I 激活 ABC1 和 ApoAI promoter, 增加 ApoAI, ApoAII 和 SRBI 蛋白合成, 抑制 ApoCIII 蛋白生成的研究

方法 2: ABC1 和 ApoAI 基因 promoter 部分的测定

1) 取稳定转染了 ABC1 和 ApoAI 基因 promoter 部分的 HepG2 细胞株 0.5ml (浓度为  $2 \times 10^4$ /ml) 细胞悬液接种于 48 孔板中同瞬转染细胞培养条件培养 24 小时。

2) ABC1 激发剂于细胞培养液内和细胞培养 24 小时。

3) 去培养液, 以 PBS 缓冲液洗涤细胞二次, 待测定。测定方法见下:

a 配制 Luciferase 测定试剂

将 Luciferase Assay Substrate 冻干粉全部溶于 10ml Luciferase Assay Buffer II, 混匀, 即可。每次反应需 100  $\mu$ l。使用前必须置室温平衡。

b 配制 PBS 缓冲液

c 配制 1 $\times$ CCLR(Cell Culture Lysis Reagent)

以 4 倍体积之双蒸水稀释 5 $\times$ CCLR 即得 1 $\times$ CCLR。使用前必须置室温平衡。

操作步骤:

1) 吸去细胞培养液, 用 PBS Buffer(1ml)洗 2 遍, 注意不要移动细胞。

2) 每一 48 孔板孔中加 65  $\mu$ l 1 $\times$ CCLR, 覆盖细胞。

3) 充分吹打细胞, 将细胞碎片和液体转入离心管, 12, 000 $\times$ g 离心 5 秒, 将上清转入新管中。如时间来不及, 需将之保存于-70 $^{\circ}$ C。

4) 将 20  $\mu$ l 细胞抽提液与 100  $\mu$ l 的 Luciferase Assay Reagent (室温平衡) 用枪头混匀。

5) 设置 Luminometer (型号: Turner Designs- 2010, Turner Designs Instrument 公司, Sunnyvale, CA): STD 模式, 2 秒 delay, 10 秒检测。

6) 将管子放入 Luminometer 中, 按 Go 开始检测 (检测需在 10 秒内进行, 时间

过长, 光密度会衰变)。

方法 3: ApoAI, ApoAII, ApoCIII 蛋白测定

1) 抗原包板

Ultra Pure Human Apolipoprotein AI, ApoAII, ApoCIII 蛋白, (Academy Bio-Medical Company, Inc.) 分别稀释至 200ng/ml, 加入 Nunc 酶标板中, 每孔 50 $\mu$ l, 置湿盒中, 包板条件为 37 $^{\circ}$ C 2 小时或 4 $^{\circ}$ C 16 小时, 蒸馏水洗板 3 次, 每孔加入封闭液 100 $\mu$ l, 室温放置 1 小时以

上,用前再洗板3次。

## 2) 孵育

在普通96孔板中,混合方法如下:

**测定 ApoAI:** 一抗 Goat anti-human ApoAI(Academy Bio-Medical Company, Inc.)、二抗 Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)(Jackson ImmunoResearch)和待测培液或标准。

标准蛋白浓度配制: ApoAI 等比梯度稀释,最终浓度为 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 ng/ml;

抗体稀释: 一抗 1:50000, 二抗 1:20000;

**测定 ApoAII:** 一抗 Goat anti-human ApoAII(Academy Bio-Medical Company, Inc.)、二抗 Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)(Jackson ImmunoResearch)和待测培液或标准。

标准蛋白浓度配制: ApoAII 等比梯度稀释,最终浓度为 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 ng/ml;

抗体稀释: 一抗 1:10000, 二抗 1:20000;

**测定 ApoCIII:** 一抗 Goat anti-human ApoCIII(Academy Bio-Medical Company, Inc.)、二抗 Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)(Jackson ImmunoResearch)和待测培液或标准。

标准蛋白浓度配制: ApoCIII 等比梯度稀释,最终浓度为 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 ng/ml;

抗体稀释: 抗体稀释: 一抗 1:6000, 二抗 1:10000

空白孔: 100 $\mu$ l 缓冲液;

最大结合孔: 50 $\mu$ l 抗体混合液, 50 $\mu$ l 缓冲液;

标准/样品孔: 每孔加入抗体混合液 50 $\mu$ l, ApoAI 标准或待测培液 50 $\mu$ l;

振荡混匀, 37°C 2 小时或 4°C 16 小时孵育以上。

## 3) 抗体捕获

将 96 孔板中的孵育液转移至包被好的 Nunc 酶标板中，室温反应 30 分钟，其间缓缓摇动。

#### 5) 检测

以蒸馏水洗板 3 次，每孔加入 100 $\mu$ l 新配制的含邻苯二胺 (O-Phenylenedimine, OPD) 的缓冲底物显色液，避光反应 30 分钟，加入 25 $\mu$ l 终止液终止反应，与酶标仪波长 492nm 处测定吸光值。

#### 方法 4: SRB1 受体测定:

SRB1 是细胞膜上 HDL 的特异性受体。

1) 将 THP-1 细胞 (ATCC 公司, 目录号 TIB-202) 接种于 96 孔细胞培养板中, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养 36 小时, 待细胞分化。

2) 细胞固定。取出细胞培养板, 弃去培养液, 加入 50 $\mu$ l /孔的 PBST, 30 秒后去除 PBST。将 96 孔板敞盖置 37 $^{\circ}$ C, 30 分钟后取出, 加固定液 (70% 甲醇+3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 100 $\mu$ l /孔, 5 分钟后去除固定液, 再加 PBST, 200 $\mu$ l /孔, 放置 20 分钟, 用 PBST 再洗两次; 加抗体封闭液 (含 1% (w/v) BSA 的 10mM 磷酸盐缓冲液, pH7.4), 室温封闭 1 小时。

4) 抗体孵育及显色。弃去抗体封闭液, 用 PBST 洗两次, 将一抗 Anti-Scavenger ReceptorB Type I (SR-BI), Polyclonal rabbit anti-human antibody, (Novus Biologicals, Cat No. NB400-104) 按 1:5000 用封闭液稀释, 50 $\mu$ l /孔, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。弃去一抗反应液, 用 PBST 洗板 3 次, 将二抗 Polyclonal donkey anti rabbit IgG -HRP, (Novus Biologicals, Cat No. NB703-100) 按 1:1000 用封闭液稀释, 50 $\mu$ l /孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。弃去二抗反应液, 用 PBST 洗 5 次, 加底物显色液 100 $\mu$ l /孔, 避光室温放置 30 分钟, 加 2M 硫酸终止反应, 显色液用酶标仪测定其 492nm 处吸光值作为细胞 SRB1 表达水平。

#### 试验结果:

ABC1 (图 1): 激活 HepG<sub>2</sub> 细胞内促进 HDL 生成的靶蛋白 ApoAI (图 2)、增加 HepG<sub>2</sub> 细胞内促进 HDL 胆固醇转运的 SRB1 (图 4) 受体; 减少 HepG<sub>2</sub>

细胞内抑制 LPL 生成的靶蛋白 ApoCIII 量 (图 5)。化合物 I 同时激活控制胆固醇从细胞内流出, 控制胆固醇转化成胆酸的基因 LXR $\alpha$  LBD 活性 (图 6)。通过体外对脂质代谢关键基因、蛋白、酶和受体调控作用的测定, 化合物 I 显示了其对相关血管疾病的控制和治疗的潜在作用。(图 1—图 6)

#### 实施例 7

##### 化合物 I 调节大鼠血脂的研究

从西普尔-必凯实验动物有限公司(SIPPR/BK Ltd)获得雄性清洁级 Sprague-Dawley 大鼠。体重在 180-200g 之间(动物合格证号: 沪动合证字 152 号)。饲养于室温 22-24℃, 湿度 50-70%, 常压环境, 自然昼夜。每笼 3-4 只大鼠, 给予西普尔-必凯公司的基础大鼠饲料, 自由进水(除菌纯净水)。预养一周后, 下午(5:00-7:00)大鼠眼眶后采血, 血样 4℃放置 30 分钟后, 在 4℃环境中, 5000 转/分钟离心 15 分钟, 取血清, 4℃冰箱保存, 次日送上海市临床检验中心测定血脂。根据血脂水平, 随机分组, 15 只/组, 使每组动物达到均衡随机。每天上午 6:00 至 8:00 和下午 4:00 至 6:00 分别腹腔注射 I (I 溶于 0.1N NaOH, 用 0.1N HCL 调至 PH=7.4 (室温配制)), 阴性对照组仅腹腔注射等容量的生理盐水(相当于体重 0.5%), 同时设立 gemfibrozil (100mg/kg/day) 作为阳性对照组, gemfibrozil 是国际医学界公认的有效调节血脂药, 其主要作用在于降低血清甘油三脂, 并有降低血清胆固醇和升高 HDL-C 的作用。给药 14 天后, 禁食 12 小时以上, 于下午(5:00-7:00)眼眶后采血, 按以上方法得血清, 4℃冰箱保存, 次日送上海市临床检验中心测定血脂。动物无痛苦(乙醚吸入法)处死后立即取肝, 除去残血, 称肝重和体重, 计算肝重/体重比率。

血样分析血清总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、丙氨酸转移酶、门冬氨酸转移酶。给药前后各测定血样一次。由上海市临床检验中心用 DAKE-RXL 全自动生化分析仪测定血样品。使用试剂为原装定标液、质控、测试试剂盒(酶学法)。

化合物 I 给动物剂量为 20, 80, 240mg/公斤体重/天, 分两次给药, 上下午各一次。

#### 实验结果:

结果显示化合物 I 能显著升高 HDL-C, 升高程度呈剂量依赖型 (图 7), 升高百分率分别为 23%, 30%, 47% (图 8), 呈剂量依赖性, 而阳性对照组 gemfibrozil 则基本无升高 HDL-C 作用; 能显著升高 HDL-C/TC 比值 (图 9); 能显著降低血清甘油三脂 (图 10), 降低程度随剂量升高而有下降, 三个剂量的降低百分率分别为 56%, 49%, 46% (图 11), 该化合物降低血清甘油三脂的作用程度远远高于阳性对照组 gemfibrozil, 阳性对照组 gemfibrozil 仅降低 36%; 化合物 I 能显著降低 LDL-C (图 12), 降低程度呈剂量依赖型, 三个剂量的降低百分率分别为 14%, 14%, 22% (图 13), 呈剂量依赖性, 阳性对照组 gemfibrozil 仅降低 15%; 化合物 I 在显著调节血脂含量的同时, 与阳性对照药 gemfibrozil 相比, 它不增大肝脏/体重比系数, 即对肝脏无损伤功能, 而 gemfibrozil 显著升高肝脏/体重比系数 (图 16)。(图 7—图 16)

以上这些血样分析数据具有重要的预防和治疗外周血管疾病、冠心病、中风疾病和血管再狭窄等血管疾病的作用。

本发明的另一实施方案为治疗和预防外周血管疾病、冠心病、中风疾病和血管再狭窄等血管疾病。它包括对需要治疗的哺乳动物给予化合物 I 的有效剂量。有效剂量是指治疗或预防哺乳动物血管病所需要的剂量。该化合物通常以约 50mg 至 2000mg/天给药, 每天一至四次给药。这些相同的剂量水平可用于血管疾病的治疗和预防, 用于升 HDL-C、降 LDL-C 和 TG。

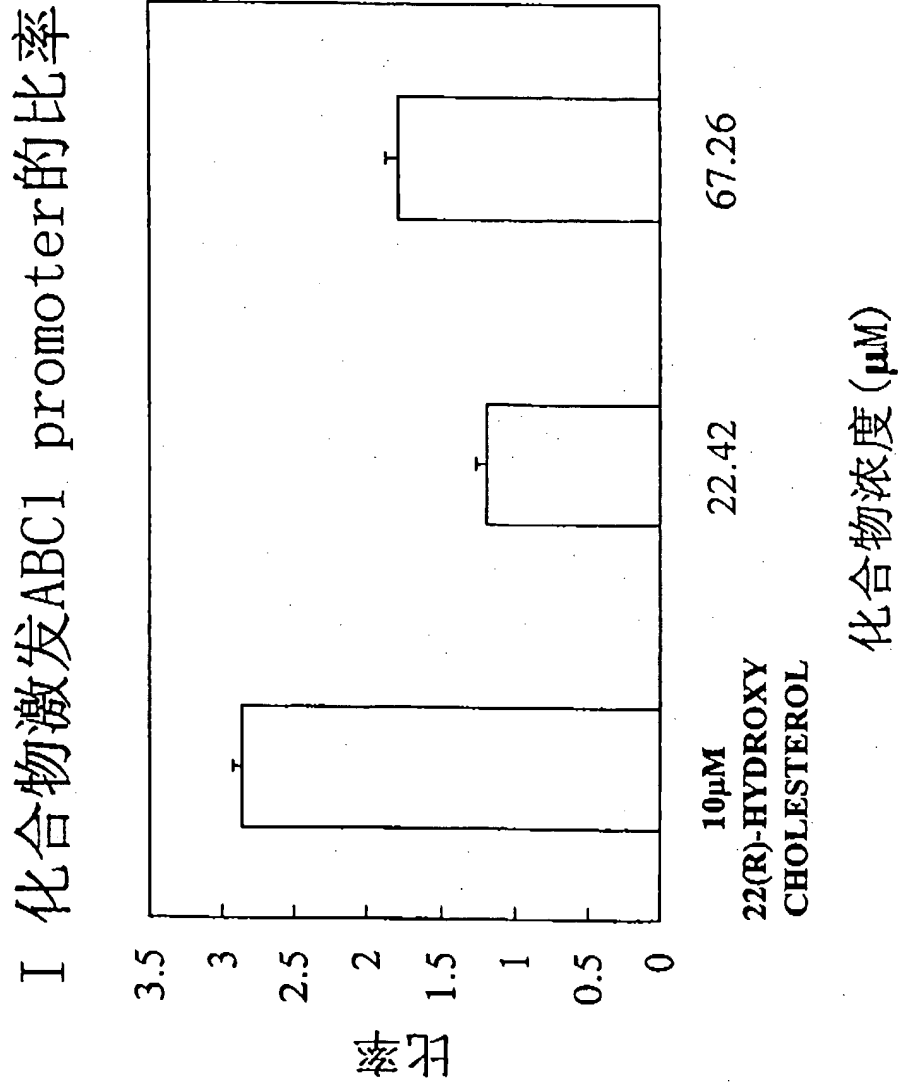


图 1

## I 化合物增加HepG-2细胞生产ApoA-I蛋白

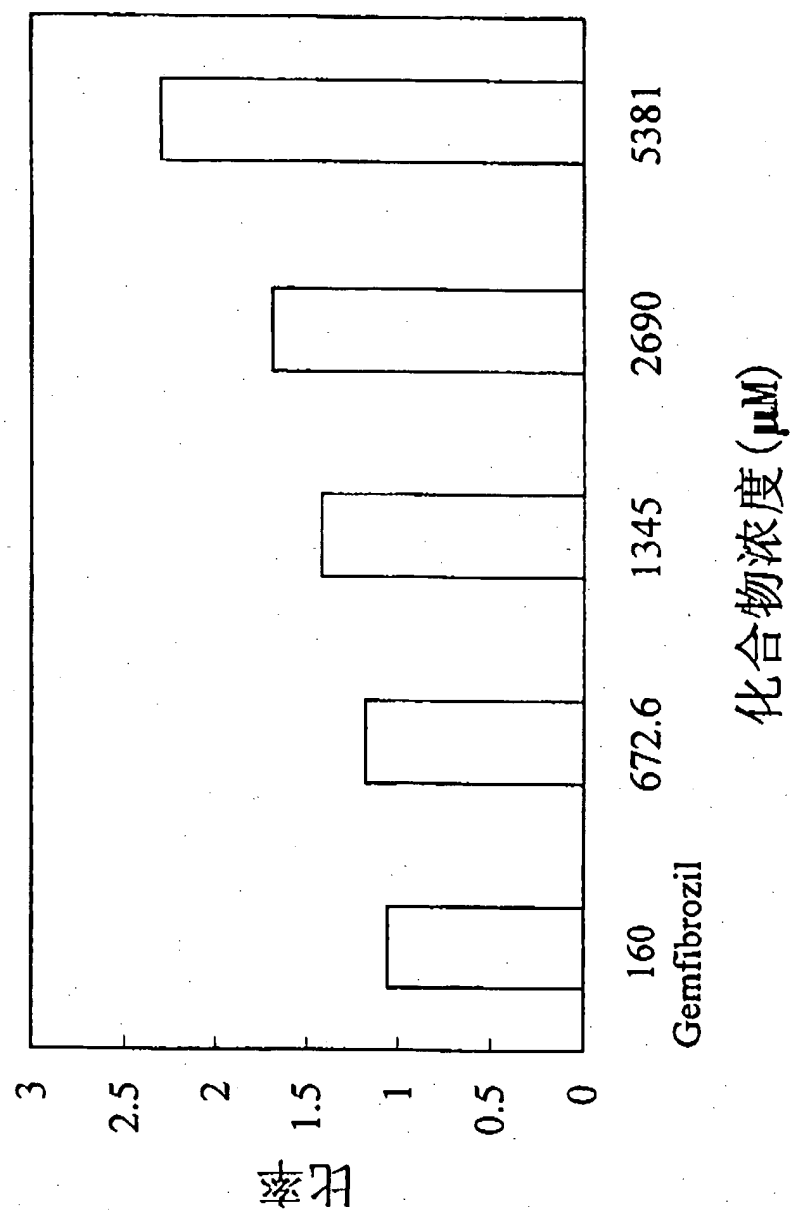


图 2



## I 化合物增加 HepG-2 细胞生产 ApoA-II 蛋白

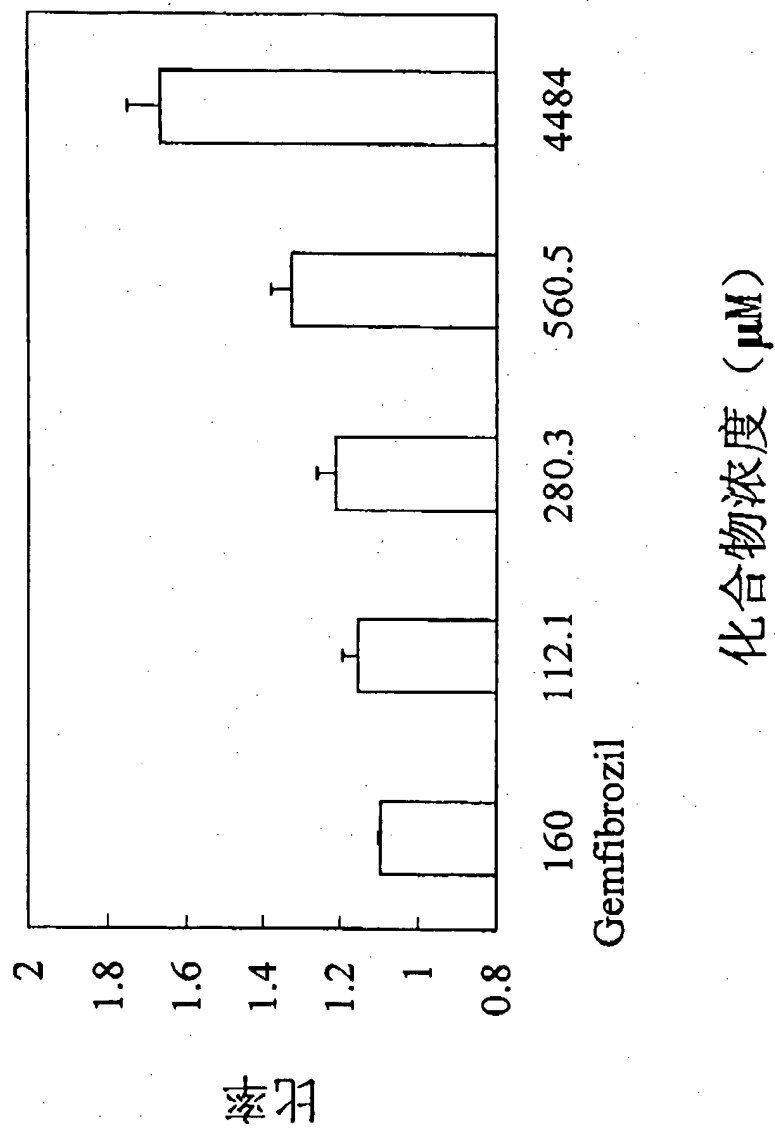


图 3

# I 化合物对THP-1细胞表达SR-BI水平的影响

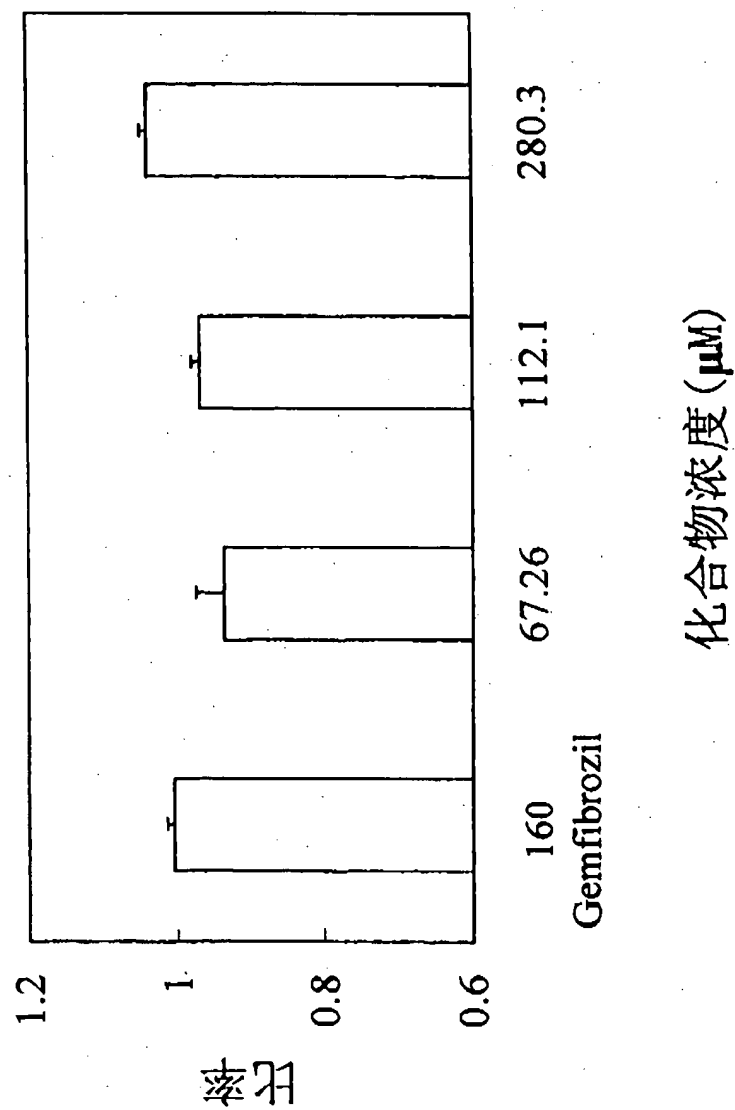


图 4

# I 化合物抑制HepG-2细胞生产ApoC-III蛋白

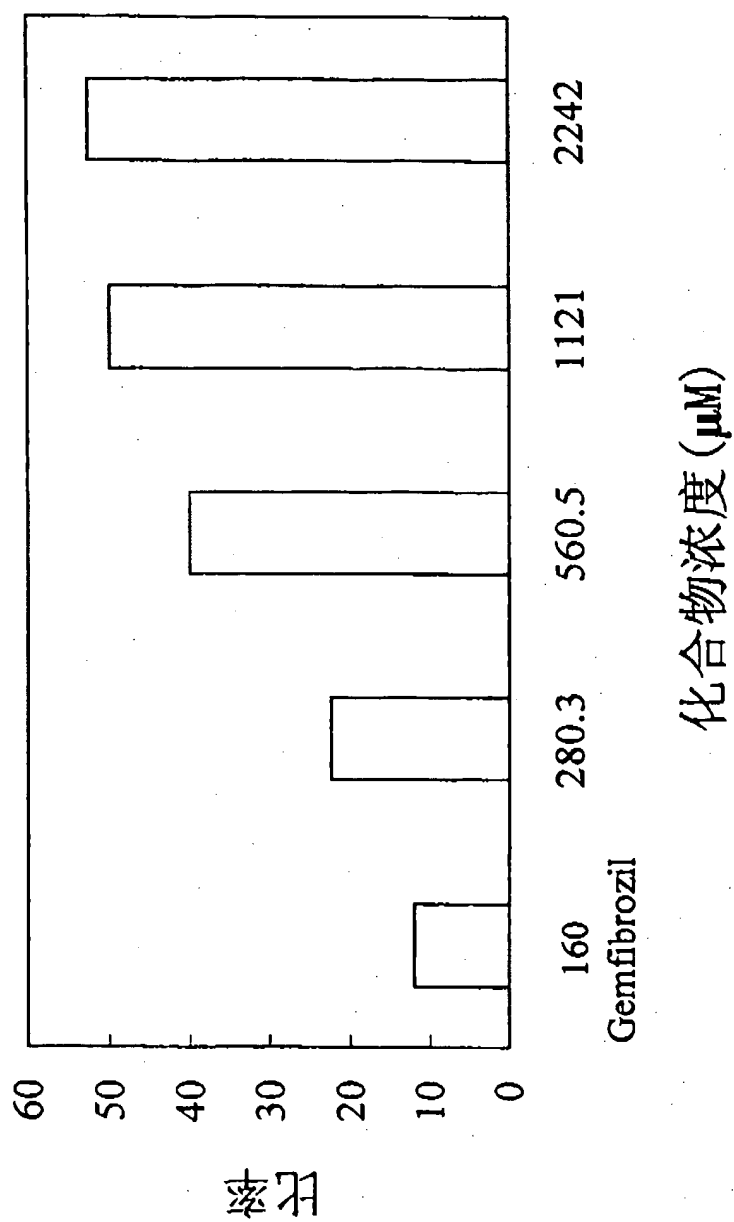


图 5

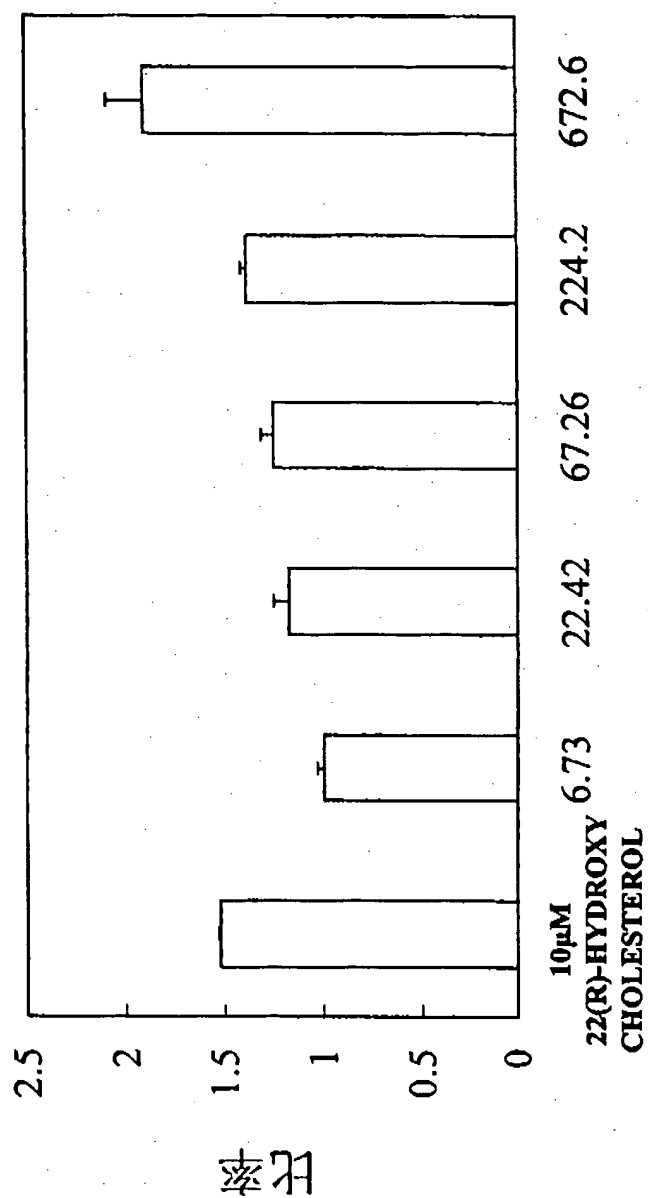
I 化合物增加LXR  $\alpha$  配体结合区活性比率化合物浓度 ( $\mu\text{M}$ )

图 6

# I 化合物升高SD大鼠血清高密度脂蛋白 胆固醇(HDL-C)水平

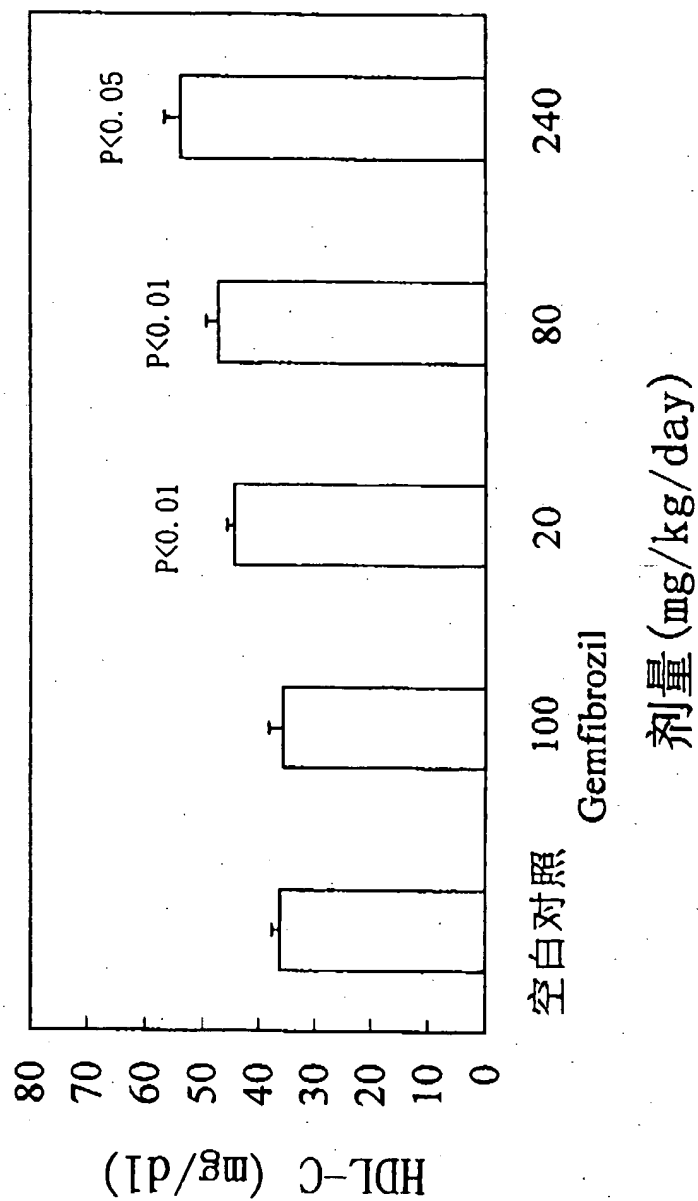


图 7

I 化合物升高SD大鼠血清高密度脂蛋白  
胆固醇 (HDL-C) 百分比

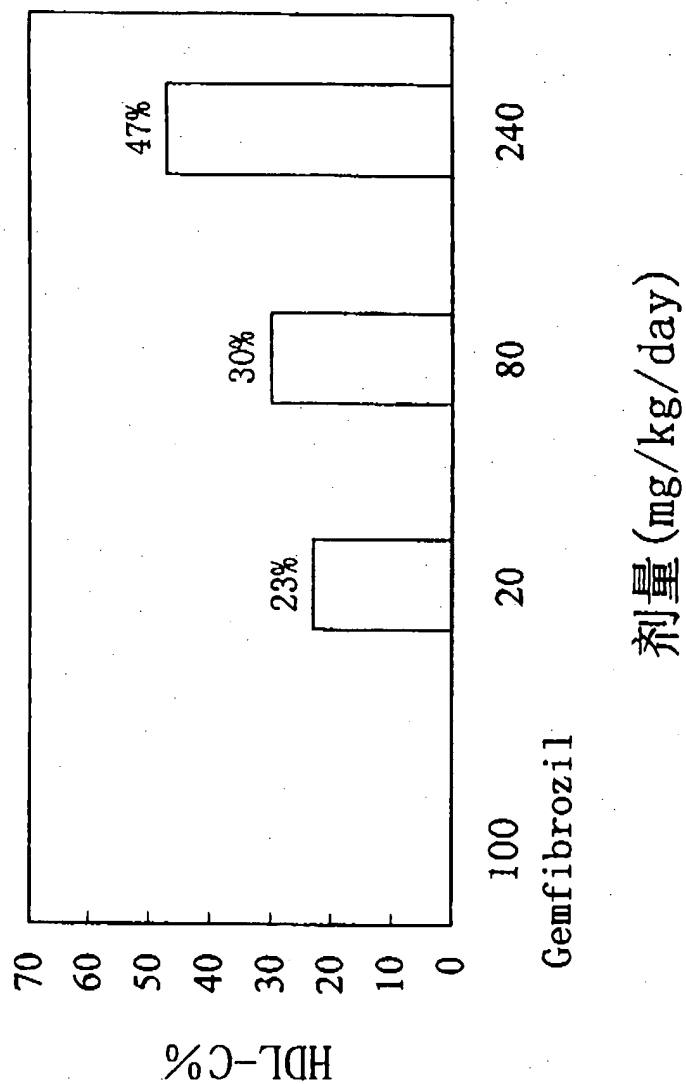


图 8

# I 化合物升高SD大鼠血清HDL-C/TC的比值

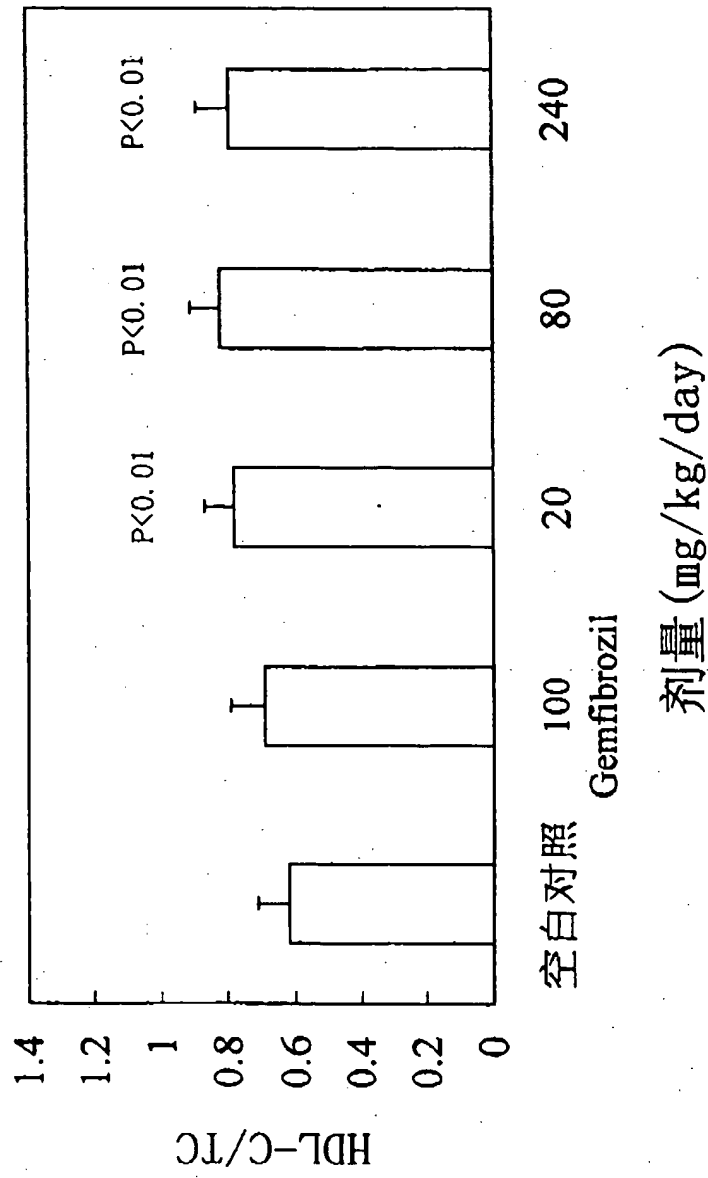


图9

## I 化合物降SD大鼠血清甘油三脂(TG)水平

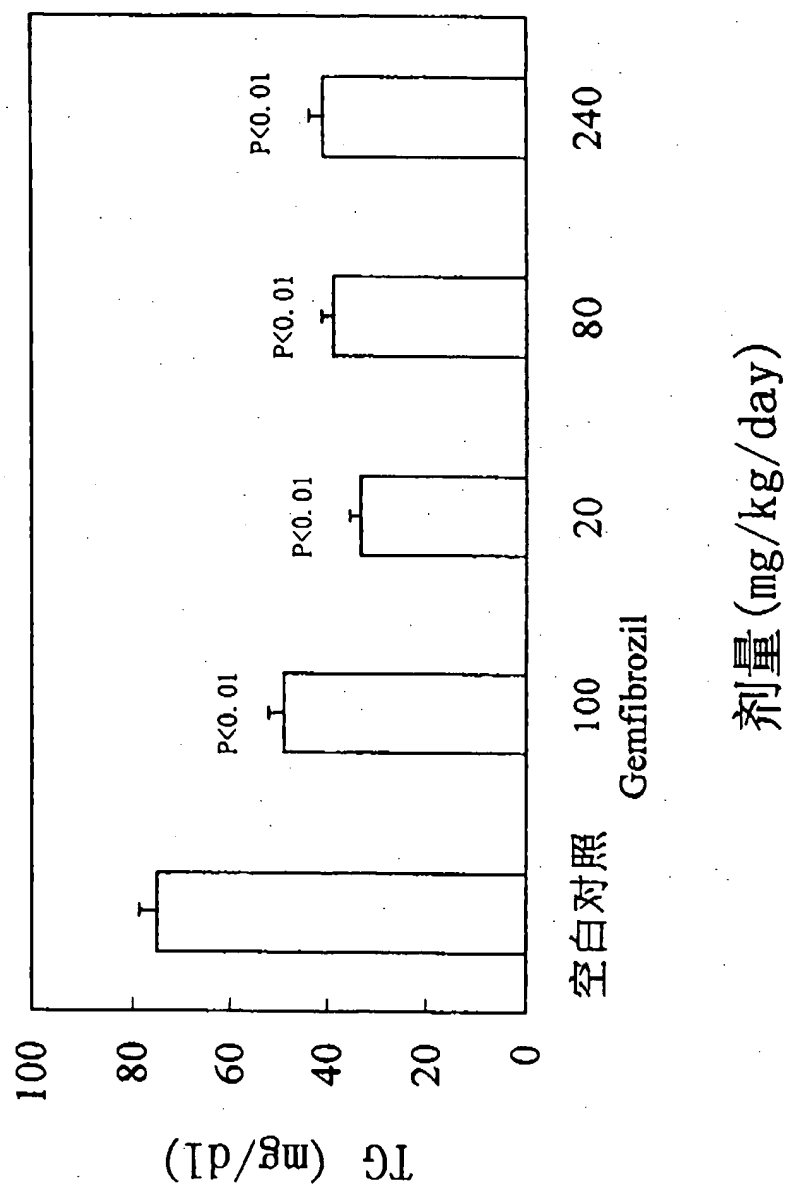


图 10



I 化合物降低SD大鼠血清甘油三酯 (TG)  
百分率

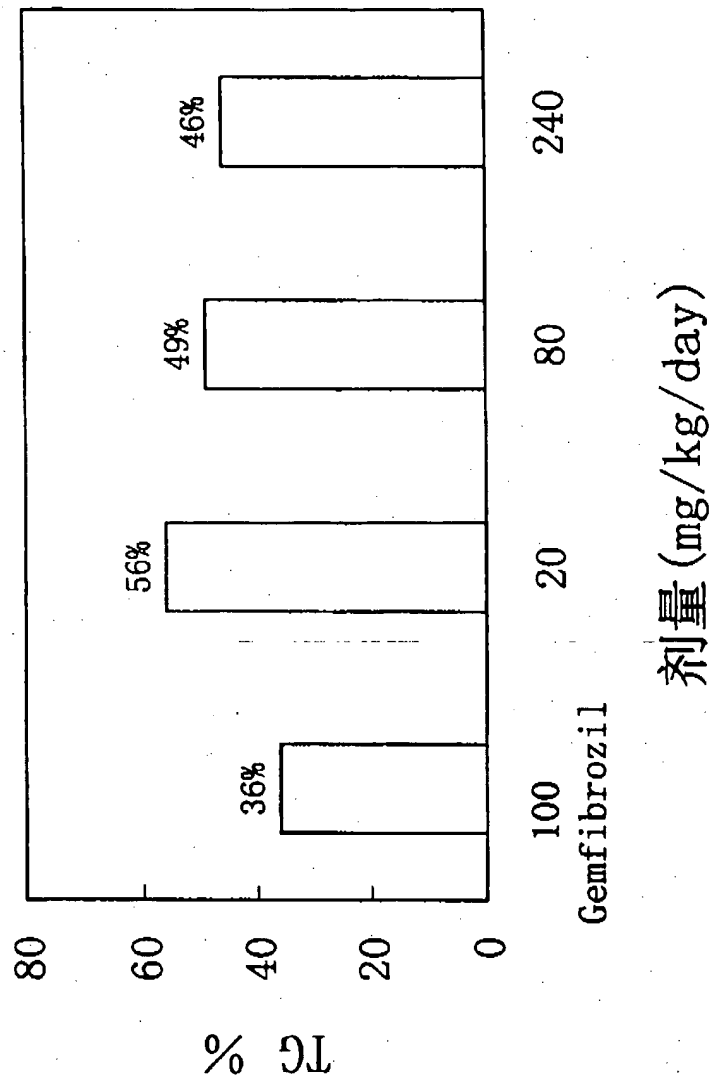


图 11

# I 化合物降低SD大鼠血清低密度脂蛋白 胆固醇(LDL-C)水平

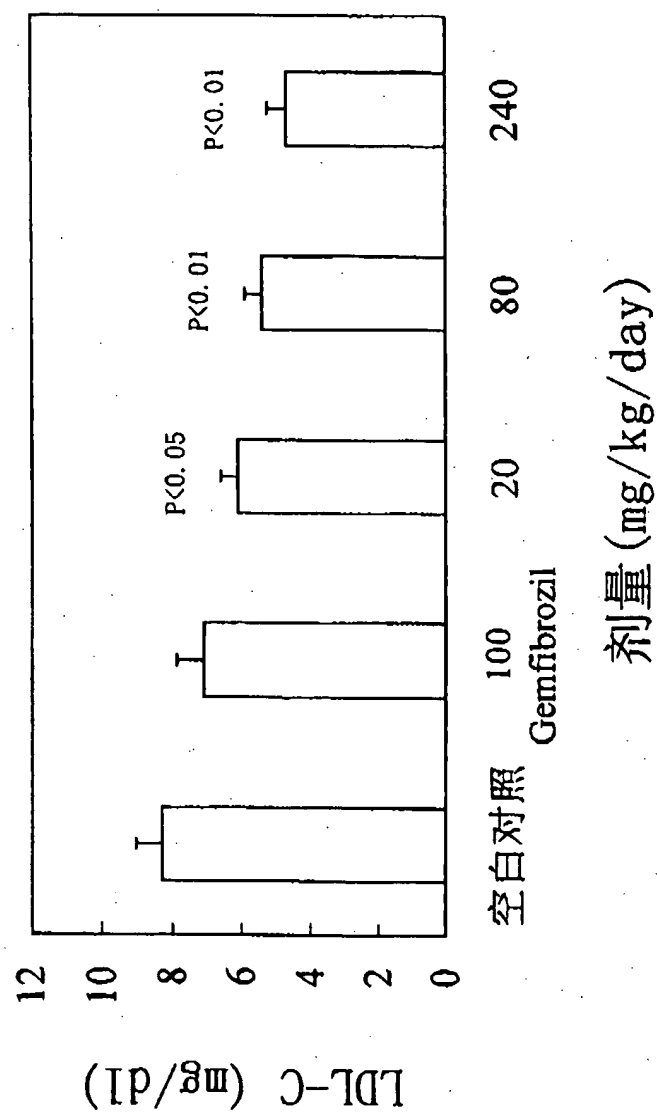


图 12

## I 化合物降低SD大鼠LDL-C百分率

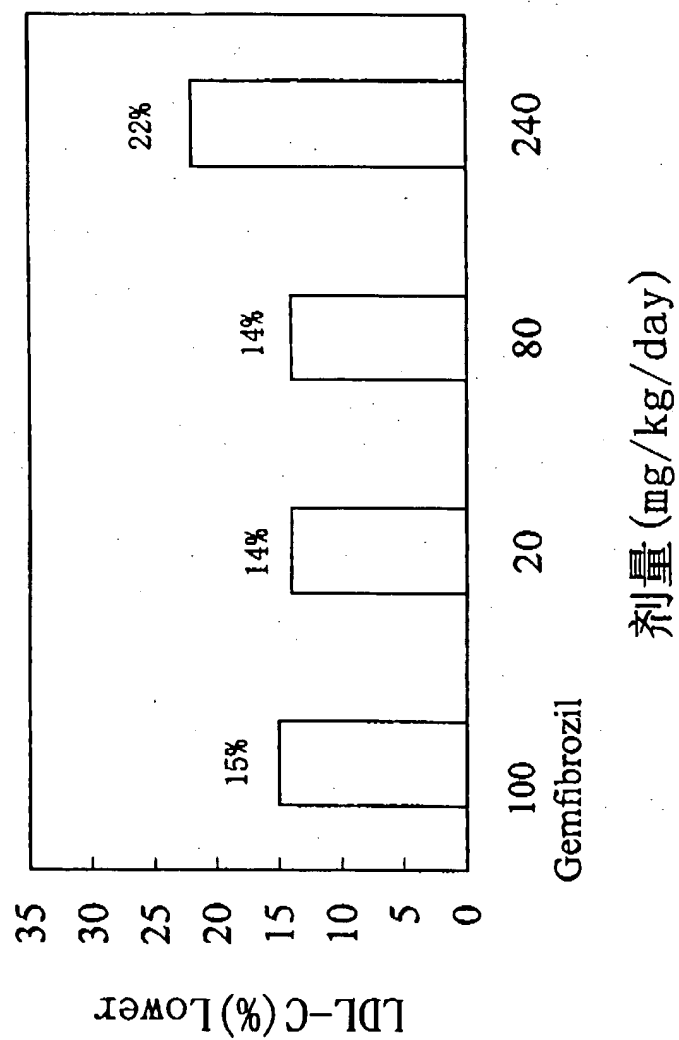


图 13

I 化合物降低SD大鼠的血清非高密度脂蛋白  
胆固醇(Non-HDL-C)水平

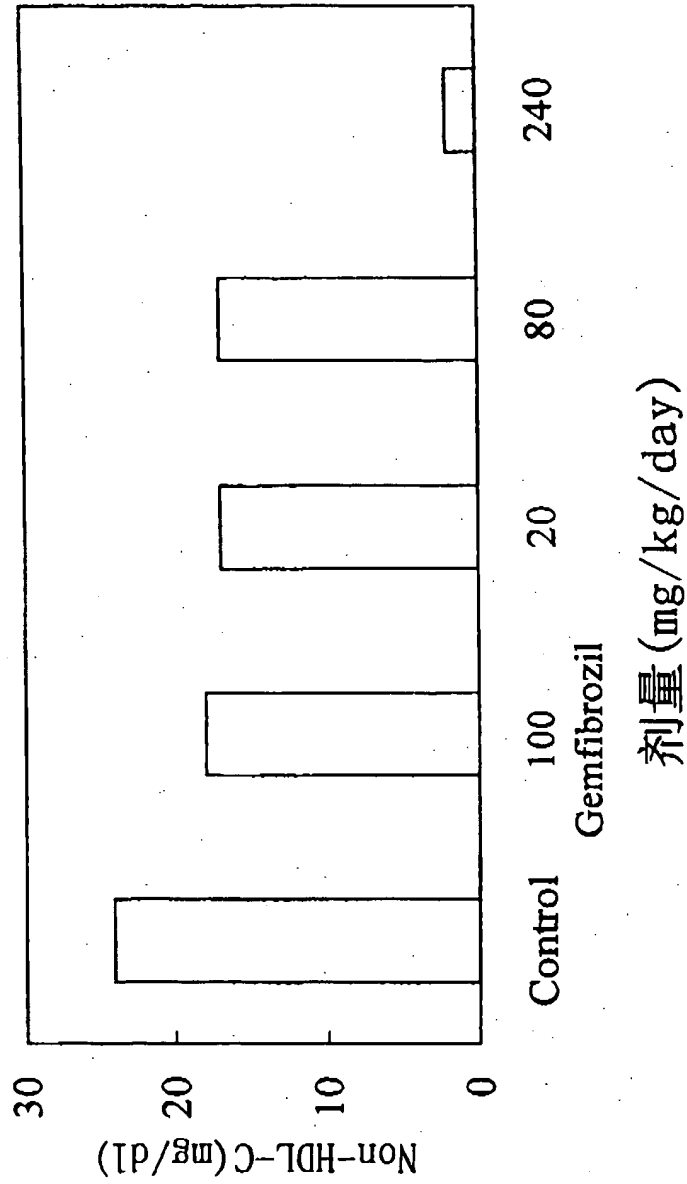


图 14

## I 化合物对SD大鼠血清总胆固醇(TC)水平影响

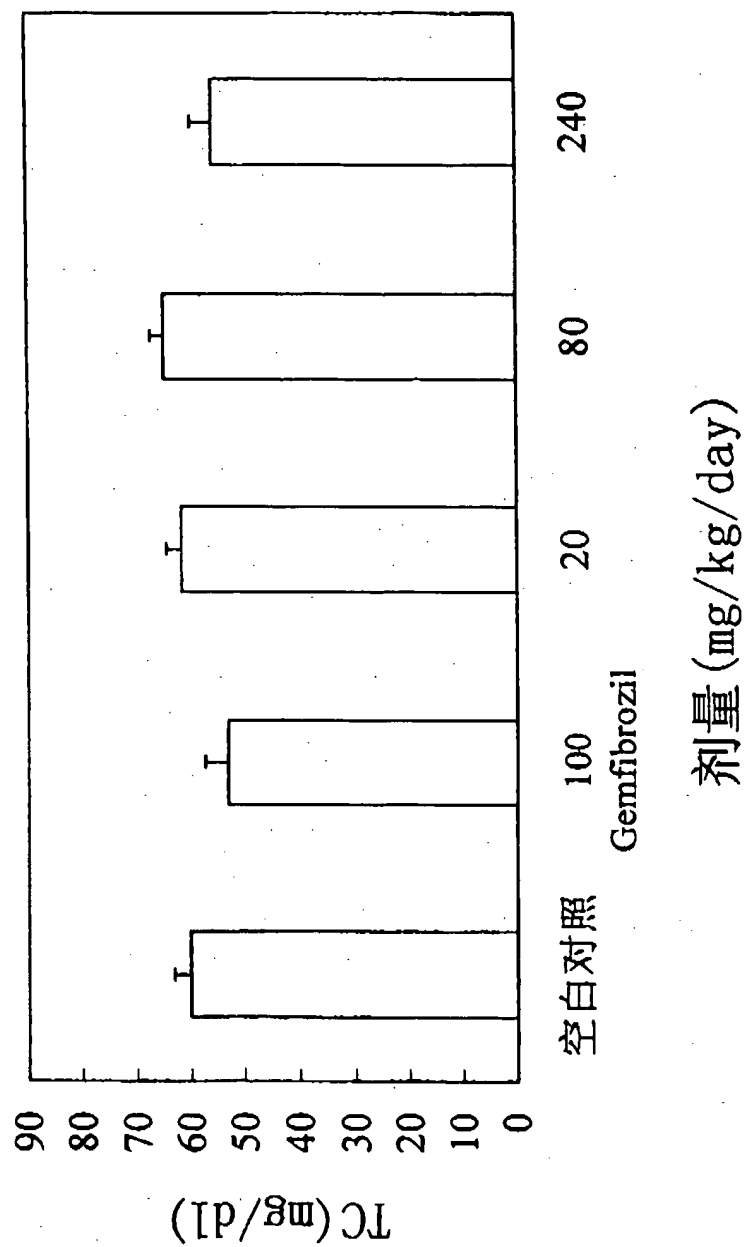


图 15

# I 化合物和Gemfibrozil对SD大鼠肝重/体重比值的影

响

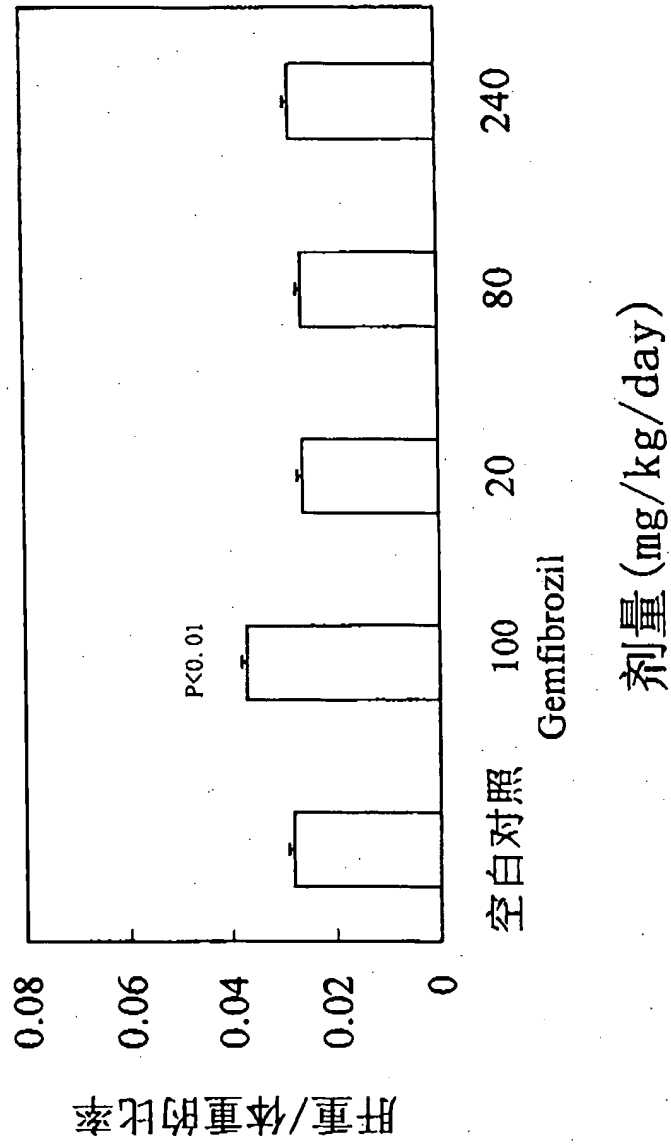


图 16

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**